

ネコ糞便内ウイルスの検索

望月雅美・山川 瞳*

(家畜微生物学研究室)

昭和62年7月27日 受理

Search for Viruses in Cat Feces

Masami MOCHIZUKI and Makoto YAMAKAWA

(*Laboratory of Veterinary Microbiology*)

緒 言

ウイルス性下痢症はヒトを含む哺乳類・鳥類で広範囲にわたる発生が認められている。特に乳幼児や幼若動物においては高い罹患率と致死率を示すため、臨床上重要な疾病の一つとなっている。イヌやネコなどの「伴侶動物」の下痢症はヒトと生活環境を共にする点から獣医臨床のみならず、公衆衛生上も重要である^{6, 9, 14, 35)}。先に著者らは本邦のイヌからロタウイルスを初めて検出し、イヌが人畜共通伝染病因子であるロタウイルスの保有動物（感染源）として危険性を有している点を指摘した^{22~24)}。本研究ではネコのウイルス性下痢症解明のため、ネコ糞便内に排泄されるウイルスの様相を探り、あわせて公衆衛生的観点からの考察を加えた。

材 料 と 方 法

1. 被検材料

1985年9月から1986年12月までの16ヶ月間に学外企業の Minimal-diseased cats コロニー、本学附属家畜病院来院ネコ、およびその他の目的のために搬入された実験用ネコ、合計124匹（正常便108例、下痢便16例）から糞便を採取した。糞便は抗生物質（ペニシリンGカリウム100単位/ml、硫酸ストレプトマイシン100μg/ml）添加 PBS で10%乳剤とし、分別遠心操作（2,000rpm 15分間と 10,000rpm 15分間）後、得られた上清を被検材料とした。

本研究の一部は文部省科学研究費補助金（No.61760262）によった。

本研究の概要は著者の一人、山川 瞳の農学修士学位論文（昭和62年3月）の一部である。

* 現在、農林水産省家畜衛生試験場・茨城県筑波郡谷田部町観音台3-1-1

Present address: National Institute of Animal Health, 3-1-1, Kan-nondai, Yatabe, Ibaraki.

2. ウィルス検出法

現在、ネコの主要な腸内ウイルス、あるいはその可能性があるパルボウイルス、ロタウイルス、コロナウイルス、およびカリキウイルスに焦点をあて検出を試みた。

（1）パルボウイルス

パルボウイルスの検出には、イヌパルボウイルスの検出に用いた糞便血球凝集・凝集阻止試験（F-HA/HI）法^{18, 21)}を応用した。本方法にて陽性を示した材料には細胞培養法によるウイルス分離法を併用した。ウイルス分離にはパルボウイルスに感受性の高い Crandell feline kidney (CRFK) 細胞を用いて、既に報告した方法^{15, 20)}にて実施した。ウイルスは抗イヌパルボウイルス29F株免疫血清を用いた免疫電子顕微鏡法（IEM）にて同定した。

（2）ロタウイルス

ロタウイルスの検出には既に報告した逆受身血球凝集・凝集阻止試験（RPHA/HI）法²²⁾を用いた。陽性を示した検体は、CRFK 細胞、ネコ肺細胞、ネコ胎仔線維芽細胞、初代ネコ腎細胞、およびアカゲザル胎仔腎（MA 104）細胞とトリプシンを用いて、ロタウイルスの分離に適切な条件下^{22, 24)}でウイルス分離を試みた。ロタウイルスの同定は、抗ウシロタウイルス Lincoln 株家兔免疫血清を用いた IEM²²⁾にて行った。

（3）コロナウイルス

既知のネココロナウイルス（ネコ伝染性腹膜炎：FIP コロナウイルス：FIPV とネコ腸内コロナウイルス：FECV^{27~29)}）株に対して感受性を示すといわれる細胞系のうち入手可能であった CRFK 細胞^{3, 7)}をウイルス検出に用いた。被検材料は細胞浮遊時に接種し³⁾、CPE を指標にして 4~5 代、盲継代した³⁹⁾。下痢便全例、および正常便53例については初回接種後 4 代目の細胞を用いて酵素抗体法（Avidin-Biotin peroxidase Complex: VECTASTAIN ABC Kit, Vector

Lab., Inc.) にてウイルス抗原の検索を実施した。一次血清にはイヌコロナウイルス (CCV) 5821株に対する中和抗体価が512,000倍を示した野外ネコ血清²⁵⁾を1,000倍に希釈して用いた。ウイルス抗原陽性対照細胞としてCCV 5821株感染CRFK細胞を用意した。

(4) カリキウイルス

カリキウイルスの検出はCRFK細胞を用いて常法に従い、CPEを指標としたウイルス分離法を試みた。分離ウイルスはネコパルボウイルス抗体が陰性(8倍以下)、ネコカリキウイルス(FCV) F9株に対し陽性(2048倍以上)を示したネコ血清¹⁹⁾を用いてIEMにて同定した。

3. その他の

細胞培養法によるウイルス分離・検出では、CPEの有無に関係なく総ての培養細胞をメイグリンワルド・ギムザ染色し、封入体、巨細胞などの、変化の有無を検査した後に陰性と判定した。

IEMの陽性対照ウイルスとして、ネコ汎白血球減少症(FPL)ウイルス(FPLV)TU 1株¹⁵⁾、FCV F2株³⁶⁾、イヌロタウイルスRS 15株²²⁾、およびCCV 5821株を用いた。

結 果

パルボウイルス、ロタウイルス、コロナウイルスおよびカリキウイルス検索結果の概要をTable 1に示した。

1. パルボウイルス

Table 1に示したごとく、2例(No.8-2とNo.12)の正常便がF-HA/HI法で陽性を示したが、細胞培養法でウイルスが分離されたのは1280倍のHA値を示したNo.12のみであった。No.8-2のHA値は160倍であった。しかしNo.8-2の糞便上清中にはFig. 1に示したように直径約20nmの球形ウイルス粒子が

認められ、これらの粒子はIEMでパルボウイルスと同定された。Fig. 2とFig. 3には糞便No.12からCRFK細胞に分離されたパルボウイルスとIEM陽性特異凝集像を示した。

2. ロタウイルス

RPHA/HI法による検索の結果、同腹の健康仔ネコ(約一ヶ月齢)3匹の糞便(正常)が陽性を示し、そのRPHA値はNo.2-2とNo.10の2例は640倍、No.11は1280倍以上であった。これら3例の糞便中には多数のロタウイルス様粒子(直径約75nmのdouble-shelled particles: Fig. 4と、直径約65nmのsingle-shelled particles)が検出された。No.10とNo.11では他のウイルス粒子やウイルス様粒子は認められなかったが、No.2-2の糞便中には直径約20-30nmの小型球型粒子(small round particles: SRP)が少數検出された。

これらのロタウイルス様粒子はFig. 5に示したごとく、抗ウシロタウイルスLincoln株免疫血清を用いたIEMで特異的に凝集し、ロタウイルスと同定された。しかし、試みたいづれの細胞培養条件にてもウイルスは分離されなかった。なお、本項ロタウイルスの検索結果のうち、1985年9月から1986年6月までの10ヶ月間の合計104例の結果は速報の必要性があったため、既に他誌に発表した²⁶⁾。

No.2-2に認められたSRPは抗パルボウイルス免疫血清を用いたIEMでも凝集せず、CRFK細胞を用いたウイルス分離法でも陰性であった。しかし、これら3匹のネコの糞便をプールし、健康仔ネコ3匹に経口投与した結果、ロタウイルスばかりでなく、本SRPも再度、実験ネコ糞便中に認められ、ネコ腸内で増殖した可能性が示唆された。本SRPは塩化セシウム密度勾配遠心法で密度1.35-1.39g/mlの部分に多数認められた(Fig. 6)。

Table 1. Summary of viruses detected in cat feces

| Feces | Parvovirus ^{*1} | Rotavirus ^{*2} | Coronavirus ^{*3} | Calicivirus ^{*4} |
|-----------|--------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Normal | 2 / 108(1.9%) | 3 / 108(2.8%) | 0 / 108 | 1 / 108(0.9%) |
| Diarrheal | 0 / 16 | 0 / 16 | 0 / 16 | 0 / 16 |
| Total | 2 / 124(1.6%) | 3 / 124(2.4%) | 0 / 124 | 1 / 124(0.8%) |

*¹: Parvoviruses were examined by fecal hemagglutination (HA) and HA-inhibition test, virus isolation in CRFK cells, and an immune electronmicroscopy (IEM).

*²: Rotaviruses were examined by reverse passive hemagglutination (RPHA) and RPHA-inhibition, and IEM.

*³: Coronaviruses were examined by virus isolation in CRFK cells and detection of viral antigens in the cells by an enzyme-linked immunosorbent assay with a cat serum which possessed a neutralizing antibody titer of 1 : 512,000 against a canine coronavirus strain 5812.

*⁴: Caliciviruses were examined by virus isolation in CRFK cells and IEM.

3. コロナウイルス

Table 1 に示したように、検査した124例の糞便からはコロナウイルスの存在を示すような結果は何も得られなかった。

4. カリキウイルス

細胞培養に接種した被検材料中、正常便1例 (No. 9-2) にカリキウイルスによると考えられる CPE の発現が認められたが、残りは陰性であった。CPE は接種後短時間で発現し、核内封入体・巨細胞形成は陰性で、エーテル耐性を示した。本 CPE 発現ウイルスは Fig. 7 に示したごとく、IEM で特異的に凝集し、総合的に判定して FCV と同定された。

考 察

現在、ネコに腸炎・下痢症を発現させる、ないしはその可能性を有しているウイルスとして、FPLV¹⁰⁾, FCV³⁴⁾, コロナウイルス²⁷⁾, ロタウイルス^{5, 33)}, およびアストロウイルスがあげられる。なかでも FPLV は古くから著明な消化器系病因子として知られ、ネコ伝染性腸炎とも呼ばれてきた。FPLV の起病性は強く、免疫のないネコは年齢に関係なく感染し発病するが、典型的な症状（腸炎）の発現は若齢獣ほど顕著である。FPL 感染・回復後、数週間にわたりウイルスが糞便中に排泄される場合もある。今回、2例の正常便から FPLV が検出されたが、おそらくこの2例のネコは不顯性感染、あるいは感染回復の直後にあったものと考えられる。

FCV は主要なネコ上部気道感染症因子である³⁴⁾。個体差はあるが、多量のウイルスが口・咽頭部より唾液中に排泄される。気道感染回復後も主として扁桃に持続感染し唾液に排泄され^{13, 30, 38)}、糞便からも検出される。今回の検索ではわずか1例のネコからしか検出されず、これは予想をはるかに下回った。また唾液から FCV が分離されながら糞便から回収されない例もあった。一部のウイルス株には下痢症との関連を示唆する報告もある^{30, 37)}。カリキウイルスは比較的抵抗力は強いものの酸性 (pH 3) 下ではエンテロウイルスのごとく安定ではないことから、向陽性の FCV 株の存在も十分に示唆され、今後の研究が必要である。最近になって、ヒトをはじめとする各種動物下痢症病因子の探究により、ヒト¹⁷⁾、イヌ⁸⁾、ウシ³²⁾、ブタ⁴⁾、ミンク¹⁶⁾などからもカリキウイルスが検出されるようになってきている。

ネコに感染するコロナウイルスには FIPV と FECV がある^{27~29)}。CCV やブタ伝染性胃腸炎ウイルスもネ

コに不顯性感染し、抗体産生をみる^{1, 31)}。FIPV 株のなかには腸炎を起こす株もあり、FIPV と FECV は同一ウイルスの病原性変異株と考えられている²⁹⁾。既知の両ウイルス分離株はともに *in vitro* で増殖しやすい株 (CCV 型) と増殖しにくい株とに分けられる²⁹⁾。先に我々が調査した抗 CCV 抗体陽性率は正常・健康なネコで 36.7%，病状を呈しているネコ群ではそれ以上 (~72.7%) であった²⁵⁾。これらの抗体の大部分はネココロナウイルスのうち CCV 型 (type II)²⁹⁾ 感染によるものと考えられる。本研究で応用した方法により、少なくとも CCV 型のネココロナウイルスが検出できるものと考えられたが、結果は全例とも陰性であった。従って、ネコの糞便中にコロナウイルスが検出されることは少ないと結論されるべきであろう。しかしネココロナウイルスに関しては十分に解明されておらず、不明な点が多いことから、腸内ウイルスとしての意義は今後の研究に待たなくてはならない。

本研究でわが国のネコからもロタウイルスが検出されたことは非常に意義深い。これまでネコとロタウイルスの関係を示す研究報告は数少なく^{2, 5, 11, 33)}、ウシやブタなどの場合と異なり、ネコにおける本ウイルスの下痢症因子としての意義は小さそうである。しかしながら、本研究で検出されたロタウイルスがネコのロタウイルスか否かは別問題として、ネコがイヌと同じく²²⁾、ヒトの感染源として重要であることには疑いの余地はない。血清疫学調査では既にこの点は推察されてはいたが²³⁾、本研究がその直接証明となった。しかし、ロタウイルスを排泄しているネコは Table 1 に示すように数少ないと考えられる。

全般的な考察として、検索を開始する前の予想よりはるかに低いウイルス検出率であった。この種の検索には偶然性が強く関与すると考えられ、本研究の結果には強い普遍性はないかもしれない。本研究成果のうち最も注目すべきはロタウイルスの検出である。ヒトでは乳幼児を主体にして、主に寒冷期に感染・流行している。このネコ由来のロタウイルスは細胞培養に分離できなかったため、ヒト血清中の本ロタウイルスに対する血清型抗体の検出はできなかった。ヒトの感染源はやはりヒトと考えられるが、生活環境内にはその他にも多種の感染源が存在する。その中には明らかにペットであるイヌとネコも含まれることが判明した。1984年から1986年にかけて採集したヒト血清68例（獣医師と獣医学科学生28例、動物とほとんど接触のない一般人40例）中には CCV, FPLV あるいは FCV に対する有意の抗体は検出されていないが、今後はヒト

生活環境に入りこんでいるイヌ、ネコ、トリなどのペット動物をウイルス性下痢症の面からも公衆衛生的に監視していく必要があると考える。

要 約

ネコのウイルス性下痢症解明のための基礎的研究として、ネコ糞便内に排泄されるウイルスの検索を試みた。1985年9月から1986年12月にかけて集めたネコの糞便124例（正常便108例、下痢便16例）を材料として、次の結果を得た。

1. コロナウイルスは検出されなかつたが、パルボウイルスは2例(1.6%)、カリキウイルスは1例(0.8%)に検出された。
2. ロタウイルスが3匹の同腹健康仔ネコの糞便に検出されたが(2.4%)、細胞培養には分離できなかつた。

文 献

- 1) Barlough, J.E., Stoddart, C.A., Sorresso, G.P., Jacobson, R. H. and Scott, F. W.: Experimental inoculation of cats with canine coronavirus and subsequent challenge with feline infectious peritonitis virus. *Lab. Anim. Sci.*, **34**, 592-597 (1984)
- 2) Birch, C. J., Heath, R. L., Marshall, J. A., Liu, S. and Gust, I. D.: Isolation of feline rotaviruses and their relationship to human and simian isolates by electropherotype and serotype. *J. Gen. Virol.*, **66**, 2731-2735 (1985)
- 3) Black, J. W.: Recovery and *in vitro* cultivation of a coronavirus from laboratory-induced cases of feline infectious peritonitis (FIP). *Vet. Med./ Small Anim. Clin.*, **75**, 811-814 (1980)
- 4) Bridger, J. C.: Detection by electron microscopy of caliciviruses, astroviruses and rotavirus-like particles in the feces of piglets with diarrhoea. *Vet. Rec.*, **107**, 532-533 (1980)
- 5) Chrystie, I. L., Goldwater, P. N. and Banatvala, J. E.: Rotavirus infection in a domestic cat. *Vet. Rec.*, **105**, 404-405 (1979)
- 6) Engleberg, N. C., Holburt, E. N., Barrett, T. J., Gary, G. W., Jr., Trujillo, M. H., Feldman, R. A. and Hughes, J. M.: Epidemiology of diarrhea due to rotavirus on an Indian reservation: Risk factors in the home environment. *J. Infect. Dis.*, **145**, 894-898 (1982)
- 7) Evermann, J. F., Baumgartner, L., Ott, R. L., Davis, E. V. and McKeirnan, A. J.: Characterization of a feline infectious peritonitis virus isolate. *Vet. Pathol.*, **18**, 256-265 (1981)
- 8) Evermann, J. F., McKeirnan, A. J., Smith, A. W., Skilling, D. E. and Ott, R. L.: Isolation and identification of caliciviruses from dogs with enteric infections. *Am. J. Vet. Res.*, **46**, 218-220 (1985)
- 9) Fox, J. G., Moore, R. and Ackerman, J. I.: Canine and feline campylobacteriosis: epizootiology and clinical and public health features. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **183**, 1420-1424 (1983)
- 10) Gillespie, J. H. and Scott, F. W.: Feline viral infections. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, **17**, 163-200 (1973)
- 11) Hoshino, Y., Baldwin, C. A. and Scott, F. W.: Isolation and characterization of feline rotavirus. *J. Gen. Virol.*, **54**, 313-323 (1981)
- 12) Hoshino, Y., Zimmer, J. F., Moise, N. S. and Scott, F. W.: Detection of astroviruses in feces of a cat with diarrhea. *Arch. Virol.*, **70**, 373-376 (1981)
- 13) Kahn, D. E. and Gillespie, J. H.: Feline viruses: Pathogenesis of picornavirus infection in the cat. *Am. J. Vet. Res.*, **32**, 521-531 (1971)
- 14) Kaneuchi, C., Shishido, K., Shibuya, M., Yamaguchi, Y. and Ogata, M.: Prevalences of *Campylobacter*, *Yersinia*, and *Salmonella* in cats housed in an animal protection center. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **49**, 499-506 (1987)
- 15) Konishi, S., Mochizuki, M. and Ogata, M.: Studies on feline panleukopenia. I. Isolation and properties of virus strains. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **37**, 439-449 (1975)
- 16) Long, G. G., Evermann, J. F. and Gorham, J. R.: Naturally occurring picornavirus in domestic mink. *Can. J. Comp. Med.*, **44**, 412-417 (1980)
- 17) Madeley, C. R. and Cosgrove, B. P.: Calicivirus in man. *Lancet* i, 199-200 (1976)
- 18) Mathys, A., Mueller, R., Pedersen, N. C. and Theilen, G. H.: Hemagglutination with formalin-fixed erythrocytes for detection of canine parvovirus. *Am. J. Vet. Res.*, **44**, 150-151 (1983)
- 19) Mochizuki, M., Akaboshi, T. and Sakamoto, H.: Evaluation of micro-neutralization test for feline calicivirus and herpesvirus infections. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **49**, 903-904 (1987)
- 20) Mochizuki, M. and Hashimoto, T.: Growth of feline panleukopenia virus and canine parvovirus *In vitro*. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **48**, 841-844 (1986)
- 21) Mochizuki, M., Hida, S., Hsüan, S.-W. and Sato, H.: Fecal examinations for diagnosis of canine parvovirus infection. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **46**, 587-592 (1984)
- 22) Mochizuki, M. and Hsüan, S.-W.: Isolation of a rotavirus from canine diarrheal feces. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **46**, 905-908 (1984)
- 23) Mochizuki, M., Minami, K. and Sakamoto, H.: Seroprevalence studies on rotavirus infections of dogs and cats. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **48**, 957-964 (1986)
- 24) Mochizuki, M., Sameshima, R., Ata, M., Minami, K., Okabayashi, K. and Harasawa, R.: Characterization of canine rotavirus RS 15 strain and comparison with other rotaviruses. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **47**, 531-538 (1985)
- 25) Mochizuki, M., Sugiura, R. and Akuzawa, M.: Microneutralization test with canine coronavirus for detection of coronavirus antibodies in dogs and cats. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **49**, 563-565 (1987)
- 26) Mochizuki, M. and Yamakawa, M.: Detection of

- rotaviruses in cat feces. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **49**, 159–160 (1987)
- 27) Pedersen, N. C.: Feline infectious peritonitis and feline enteric coronavirus infections. Part 1: Feline enteric coronaviruses. *Feline Pract.*, **13**, 13–19 (1983)
- 28) Pedersen, N. C.: Feline infectious peritonitis and feline enteric coronavirus infections. Part 2: Feline infectious peritonitis. *Feline Pract.*, **13**, 5–20 (1983)
- 29) Pedersen, N. C., Black, J. W., Boyle, J. F., Evermann, McKeirnan, A. J. and Ott, R. L.: Pathogenic differences between various feline coronavirus isolates. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **173**, 365–380 (1984)
- 30) Povey, R. C. and Hale, C. J.: Experimental infections with feline caliciviruses (picornaviruses) in specific pathogen-free kittens. *J. Comp. Pathol.*, **84**, 245–255 (1974)
- 31) Reynolds, D. J. and Garwes, D. J.: Virus isolation and serum antibody responses after infection of cats with transmissible gastroenteritis virus. *Arch. Virol.*, **60**, 161–166 (1979)
- 32) Smith, A. W., Mattson, D. E., Skilling, D. E. and Schmitz, J. A.: Isolation and partial characterization of a calicivirus from calves. *Am. J. Vet. Res.*, **44**, 851–855 (1983)
- 33) Snodgrass, D. R., Angus, K. W. and Gray, E. W.: A rotavirus from kittens. *Vet. Rec.*, **104**, 222–223 (1979)
- 34) Studdert, M. J.: Caliciviruses. *Arch. Virol.*, **58**, 157–191 (1978)
- 35) Sugiyama, M., Minamoto, N., Kinjo, T. and Hashimoto, A.: Serological survey on rotavirus infection in dogs by immune adherence hemagglutination test. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **46**, 767–769 (1984)
- 36) Takahashi, E., Konishi, S. and Ogata, M.: Studies on cytopathogenic viruses from cats with respiratory infections. II. Characterization of feline picornaviruses. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **33**, 81–87 (1971)
- 37) Wardely, R. C. and Povey, R. C.: The clinical disease and patterns of excretion associated with three different strains of feline caliciviruses. *Res. Vet. Sci.*, **23**, 7–14 (1977)
- 38) Wardely, R. C. and Povey, R. C.: The pathology and sites of persistence associated with three different strains of feline caliciviruses. *Res. Vet. Sci.*, **23**, 15–19 (1977)
- 39) Woods, R. D.: Studies of enteric coronaviruses in a feline cell line. *Vet. Microbiol.*, **7**, 427–435 (1982)

Summary

Viruses excreted in cat feces were investigated for elucidating their significance in feline enteritides. Parvovirus, calicivirus, coronavirus and rotavirus were examined in 124 fecal samples (108 normal and 16 diarrheal), using the most adequate method for their detection.

Parvovirus and calicivirus were positive in 2 samples (1.6%) and in one sample (0.8%), respectively; no coronavirus was detected, however. Rotavirus-like particles were detected in 3 samples derived from a litter of healthy household kittens by reverse passive hemagglutination test and direct electronmicroscopy (EM). Although the viruses were not isolated in cell cultures, they were successfully identified as rotaviruses by an immune EM with an immune serum against the Lincoln strain of bovine rotavirus. All the feces in which the viruses were detected were normal ones.

Explanation of figures

- Fig. 1. Parvovirus detected in the Case No.8–2 feces.
- Fig. 2. Parvovirus isolated in CRFK cells from the Case No.12 feces.
- Fig. 3. Immune electronmicroscopy (IEM) of the same material in Fig. 2 with the anti-canine parvovirus immune serum.
- Fig. 4. Rotavirus particles observed in the Case No.10 feces.
- Fig. 5. IEM of the same material in Fig. 4 with the anti-bovine rotavirus immune serum.
- Fig. 6. Small round particles detected in the Case No.2–2 feces in which rotaviruses were detected.
- Fig. 7. IEM of caliciviruses isolated from the Case No.9–2 feces with a cat serum having specific neutralizing antibody titer of more than 1: 2,048 against feline calicivirus. Bars in all figures indicate 100nm.

